

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI SEKUENS HOMOLOG GEN PENYANDI *GONADOTROPIN RELEASING HORMONE* PADA IKAN NILEM HIJAU (*Osteochilus hasselti*) DAN IKAN NILEM MERAH (*Osteochillus Sp.*)

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF GENETIC MARKER OF GnRH II FROM Osteochilus hasselti and Osteochillus Sp.

Riris Yuli Valentine

Dosen Prodi Teknik Budidaya Perikanan, Politeknik Kelautan dan Perikanan Kupang

Email : ririssinaga.kkp@gmail.com

Abstrak: Tujuan penelitian ini untuk mengetahui sekuen homolog nukleotida dan domain fungsional dari gen penyandi gonadotropin releasing hormone (GnRH II) pada ikan nilem hijau dan ikan nilem merah. Penelitian menggunakan metode eksploratif dengan analisis deskriptif terhadap fragmen sekuen GnRH-II ikan nilem serta interpretasi perbedaan ciri-ciri morfometri dan fekunditasnya. Tahapan penelitian mencakup pengamatan fekunditas, pengambilan sampel otak dari ikan uji isolasi DNA genom, amplifikasi PCR, dan elektroforesis. Hasil amplifikasi gen penyandi GnRH-II nilem hijau dan nilem merah yang diperoleh adalah sepanjang 632 bp. Sekuen gen penyandi GnRH-II nilem hijau dan nilem merah tersebut memiliki kemiripan dengan sekuen asam amino cGnRH-II (*Osteochilus hasselti*) nomor aksesori AFH41000.1.

Kata kunci: GnRH-II (*gonadotropin releasing hormone-II*), nilem hijau, nilem merah, sekuen homolog.

Abstract: The study aimed to identify the homolog sequence of the functional nucleotide-binding domain of gene encoded gonadotropin releasing hormone (GnRH-II) in *Osteochillus hasselti* and *Osteochillus sp.* The explorative research uses descriptive analysis on fragments of GnRH-II sequence from both *Osteochillus spp.* and interpretation to fecundity and morphometric characteristic of the fish. Samples were taken from fish brain tissue and research stages including fecundity observation, genomic DNA isolation, DNA amplification and electrophoresis. 632 BP of gene encoding GnRH II were obtained from *O. hasselti* and *Osteochillus sp.* The sequence has similarities to the Amino acid sequence of GnRH-II of *Osteochillus hasselti* with accession number AFH41000.1.

Keywords: GnRH-II (*gonadotropin releasing hormone II*), homolog sequence, *Osteochilus hasselti*, *Osteochillus sp.*

I. PENDAHULUAN

Ikan nilem sebagai komoditi perikanan memiliki beberapa keunggulan baik dari aspek ekonomi, kelestarian lingkungan maupun budidaya. Nilai ekonomis ikan nilem meningkat setelah dijadikan produk olahan misalnya *baby fish* goreng, dendeng dan pindang, diasap dan dikalengkan. Telur ikan nilem digemari masyarakat karena rasanya yang lezat dan mempunyai peluang sebagai komoditas ekspor (Subagja *et al.*, 2006b).

Ikan nilem memiliki beberapa keunggulan. Ditinjau dari aspek lingkungan ikan nilem berperan sebagai *biocleaning agent* karena sifatnya yang suka memakan detritus dan perifiton sehingga ikan ini bisa digunakan untuk membersihkan keramba jaring apung. Dari kelompok cyprinidae ikan nilem termasuk ikan yang tahan terhadap penyakit karena pakan yang dikonsumsi didominasi oleh pakan alami dari kelompok ganggang yang banyak mengandung antibodi, serta mayoritas makanannya berupa perifiton dan tumbuhan penempel sehingga

dapat berfungsi sebagai pembersih jaring apung (Ekawati *et al.*, 2011).

Ikan nilem memiliki potensi besar serta peluang ke depan yang harus diantisipasi, namun disisi lain kendala yang dihadapi saat ini diduga bahwa telah terjadi penurunan kuantitas ikan nilem yang dibudidayakan, hal ini ditunjukkan dengan ketersediaan indukan nilem yang masih kurang. Oleh sebab itu, perlu dilakukan pemilihan pasangan induk jantan dan betina yang benar-benar matang gonad dan siap untuk dipijahkan agar tujuan skala usaha yang besar seperti untuk tujuan produksi telur nilem. Produksi telur nilem terkait dengan proses pematangan gonad dan frekuensi pemijahan induk nilem (Subagja *et al.*, 2006b). Jenis ikan nilem yang berbeda (beda spesies maupun kelamin) juga mempengaruhi produksi telur nilem dan frekuensi pemijahan induk nilem. Ikan nilem memiliki potensi reproduksi yang cukup tinggi. Fekunditas ikan nilem berkisar antara 80.000-110.000 butir (Cholik *et al.*, 2005).

Beberapa jenis nilem telah dibudidayakan di Jawa Barat yaitu nilem hijau dan nilem merah, nilem were, nilem mangot. Dalam hal ini, penelitian dilakukan hanya pada nilem hijau dan merah. Diduga, terdapat perbedaan dalam produksi telur dan tingkat pematangan gamet yang menimbulkan adanya variasi sekuen hormon khususnya pada GnRH-II pada kedua nilem tersebut. Prayogo *et al.* (2011) telah melakukan penelitian terhadap GnRH-II pada ikan nilem, namun tanpa diskriminasi berdasarkan spesies. Pada penelitian tersebut, diperoleh fragmen GnRH-II sepanjang 632bp. Untuk mendeteksi perbedaan sekuen penyandi hormon GnRH-II pada nilem hijau dan nilem merah, maka diperlukan penelitian isolasi dan identifikasi sekuen homolog gen penyandi GnRH-II pada Nilem Hijau (*Osteochilus hasselti*), dan Nilem Merah (*Osteochilus sp.*) berkelamin jantan dan betina.

II. METODOLOGI

Penelitian ini telah dilakukan kurang lebih selama tiga bulan. Kegiatan penelitian ini terbagi atas beberapa tahapan pengamatan, yaitu :

Pengamatan Morfometri dan Fekunditas

Pengamatan morfometri dilakukan dengan menyiapkan terlebih dahulu ikan uji dengan bobot tubuh nilem hijau dari tiga sampel yang digunakan berkisar antara 200 g – 215 g, sedangkan nilem merah memiliki kisaran bobot tubuh antara 160 g – 200 g.

Pengambilan Sampel Otak Nilem

Sampel otak diambil dari masing-masing tiga ekor individu jantan dan betina nilem hijau (*O. hasselti*) dan nilem merah (*Osteochilus sp.*) yang diperoleh dari Balai Pelestarian Perikanan Perairan Umum (BPPPU) Ciharang-Cianjur. Ikan nilem terlebih dahulu dibedah dengan memotong bagian kepala dan mengambil otak menggunakan pinset steril. Sampel jaringan otak dimasukkan ke dalam *ependorf* yang telah berisi RNA *later* dan dimasukkan ke dalam *cool box* lalu disimpan dalam freezer -20°C untuk kemudian dilakukan tahap berikutnya di Laboratorium.

Isolasi DNA

Isolasi DNA memiliki beberapa tahapan, yaitu: (1) Isolasi jaringan; (2) Lisis dinding dan membran sel; (3) Ekstraksi dalam larutan; (4) Purifikasi; dan (5) Presipitasi. Prinsip-prinsip dalam melakukan isolasi DNA ada 2, yaitu sentrifugasi dan presipitasi. Prinsip utama sentrifugasi adalah memisahkan substansi berdasarkan berat (Corkill dan Rapley, 2008). Isolasi DNA otak ikan Nilem Hijau dan Nilem

Merah dilakukan dengan menggunakan *Wizard Genomic purification Kit* (Promega).

Amplifikasi DNA dengan PCR

Kit Promega Go Taq® digunakan untuk mengamplifikasi Gen penyandi GnRH II Nilem Hijau dan Nilem Merah. Template DNA yang digunakan adalah DNA genom dari otak Nilem Hijau dan Nilem Merah. Primer yang digunakan adalah Primer GnRH-II F (*Gonadotrophin Releasing Hormone – Forward*) dan GnRH-II R (*Gonadotrophin Releasing Hormone – Reverse*) yang menghasilkan fragmen PCR berukuran sekitar 632bp yang telah digunakan pada penelitian *Cyprinidae* oleh Prayogo, *et al.*, (2011). Primer dan komponen reaksi PCR yang digunakan dalam penelitian adalah GnRH-II *forward primer* dan GnRH-II *reverse primer*.

Campuran reaksi PCR dibuat dengan mencampurkan 12,5 µl Go Taq® Master Mix, 1,5 µl Primer GnRH-II F, 1,5 µl Primer GnRH-II R, 2,5 µl DNA *template*, dan 7 µl *Nuclease free water* dengan total volume reaksi 25 µl. Selanjutnya, sampel hasil amplifikasi semua produk PCR (NHJ, NHB, NMJ, dan NMB) diproses lebih lanjut ke tahap sekuensing dengan mengirimkan sampel hasil amplifikasi masing-masing nilem ke 1st BASE Singapura, selanjutnya pihak 1st BASE Singapura melakukan purifikasi hasil PCR masing-masing sampel nilem. Purifikasi bertujuan untuk memurnikan produk PCR, dapat menghilangkan *smear* serta mengurangi garam yang terdapat pada produk PCR.

Analisis Data

Data-data yang diperoleh dari hasil penelitian yang dianalisis meliputi :

1. Jumlah fekunditas telur nilem hijau dan nilem betina dengan cara gravimetrik dan volumetrik
2. Fragmen pita DNA hasil elektroforesis isolat GnRH-II Nilem
3. Sekuen nukleotida hasil sekuensing dengan menggunakan pelayanan jasa sekuensing 1ST BASE di Singapura.
4. Sekuen nukleotida dan asam amino gen penyandi GnRH-II pada sampel uji dianalisis dengan membandingkan kemiripan sekuen yang ada pada GenBank menggunakan program BLAST-N dan BLAST-X.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penghitungan fekunditas nilem hijau menunjukkan nilai 55.000 – 65.618 butir telur dengan berat gonad berkisar antara 32-36,9 gr. Sedangkan fekunditas nilem merah berkisar antara 48.000 – 53.000 dengan berat gonad antara 28 g – 30,94 gr.



Gambar 1. Hasil Pembedahan Ikan nilem

Isolasi DNA genom nilem

Pengukuran kualitas hasil isolasi DNA genom nilem menunjukkan konsentrasi yang baik untuk

nilem hijau, dan layak untuk nilem merah. Konsentrasi DNA isolate dapat dilihat pada Tabel 1 sbb:

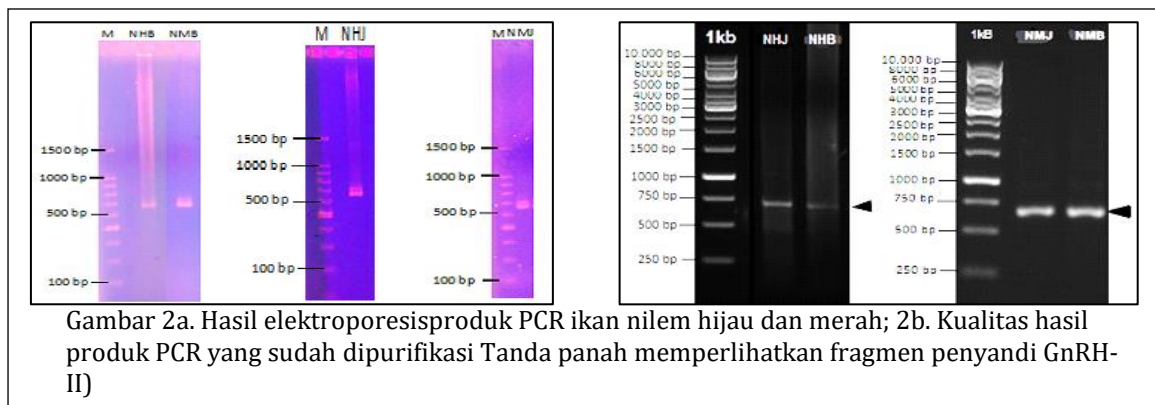
Tabel 1. Nilai Absorbansi dan konsentrasi DNA genom ikan nilem

No.	Nama Sampel	Nilai Absorbansi (nm)		Kemurnian terhadap protein
		Abs 260	Abs280	
1	NHJ	0,192	0,106	1,811
2	NHB	0,144	0,079	1,823
3	NMJ	0,058	0,034	1,706
4	NMB	0,321	0,180	1,783

Dari tabel diatas terlihat bahwa kemurnian asam nukleat kedua isolate DNA ikan nilem hijau berada pada nilai 1,811 dan 1,823 ng/ml yang berarti kualitasnya bagus, karena nilai acuan konsentrasi DNA yang baik berada pada rentang 1,8 – 2,0 ng/ml. Sedangkan kemurnian isolate DNA ikan nilem hijau mendekati nilai 1,8 yang berarti

masih layak untuk digunakan pada proses amplifikasi.

Kualitas amplifikasi PCR yang diperoleh memiliki panjang rantai nukleotida diatas 600 bp. Gambar selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar diatas memperlihatkan fragmen penyandi untuk hormone GnRH-II pada kisaran diatas 600 bp. Namun hasil juga menunjukkan artefak berupa smear yang dapat berupa garam sehingga sebelum sekensing dilakukan, perlu dilakukan purifikasi terhadap hasil PCR. Hasil purifikasi yang diperoleh dari 1st BASE Singapura dapat dilihat pada Gambar 2b.

Hasil alignment dari masing-masing keempat sekuens nukleotida menunjukkan beberapa segmen yang sejajar seperti ditunjukkan pada gambar yang dapat dilihat pada Suplementari 1. Dari gambar tersebut terlihat bahwa sekuens nukleotida yang dihasilkan oleh nilem hijau dan nilem merah yang menggunakan forward primer

memiliki dua segmen conserved domain, yakni urutan nukleotida 43 sampai 73 dan 75 sampai 127. Sementara itu, hasil pensejajaran sekuens nukleotida yang dihasilkan dari revrse primer, diperoleh tiga conserved region, yakni urutan ke 36 sampai 56, 58 sampai 169, dan 171 sampai 349. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada supplementary 1 dan 2.

Hasil basic local alignment serach tool nucleotide (BLASTn) yang dilakukan dengan kedelapan sekuens menunjukkan hasil yang paling dekat dengan *Osteochilus hasseltii* cGnRH-II gene, partial cds yang memiliki sequence id JN867722.1 . Parameter uji yang diperoleh dapat dilihat pada Tabel 2. sebagai berikut:

Tabel 2. Parameter statistik hasil pensejajaran nukleotida

Statistik	Nilem Hijau Jantan		Nilem Hijau Betina		Nilem Merah Jantan		Nilem Merah Betina	
	Forward	Reverse	Forward	Reverse	Forward	Reverse	Forward	Reverse
Bit score	277	319	585	580	166	332	179	342
Ekspektasi	2 E-141	8 E-145	0	0	8E-80	5E-172	5E-87	1E-177
%Identity	82%	95%	99%	99%	77%	95%	77%	86%

Dari hasil diatas, tampak bahwa nilem hijau betina dan nilem merah betina memiliki tingkat homologi paling tinggi dengan cDNA GnRH II nomor ID JN 867722.1 dengan nilai ekspektasi 0, BIT score 585 dan *identity* 99%. Nilai parameter yang paling jauh dari dengan *Osteochilus hasseltii*

cGnRH-II gene, partial cds yang memiliki sequence id JN867722.1 adalah nilem merah jantan dengan nilai ekspektasi sebesar 2×10^{-78} . Sedangkan nilai-nilai parameter statistic untuk pensejajaran asam amino dapat dilihat pada Tabel 3. Berikut:

Tabel 3. Parameter statistik hasil pensejajaran asam amino

Statistik	Nilem Hijau Jantan		Nilem Hijau Betina		Nilem Merah Jantan		Nilem Merah Betina	
	Forward ^a	Reverse ^b	Forward ^a	Reverse ^a	Forward ^b	Reverse ^b	Forward ^b	Reverse ^b
Bit score	191	143	191	250	126	143	157	143
Ekspektasi	3 E-22	2 E-15	4 E-22	1 E-30	3 E-13	2 E-15	2 E-17	2 E-15
%Identity	95%	93%	95%	94%	100%	93%	97%	93%

^asekuens protein dengan nomor aksesii gb|AFH41000.1

^bsekuens protein dengan nomor aksesii gb|AFH41002.1

Hasil pensejajaran protein dari dari delapan sekuens menghasilkan homologi dengan sekuens yang berasal dari dua nomor aksesii yaitu gbAFH41000.1 dan gbAFH41002.1. Tingkat homologi paling tinggi justru dimiliki oleh nilem merah jantan dengan nilai identity 100%.

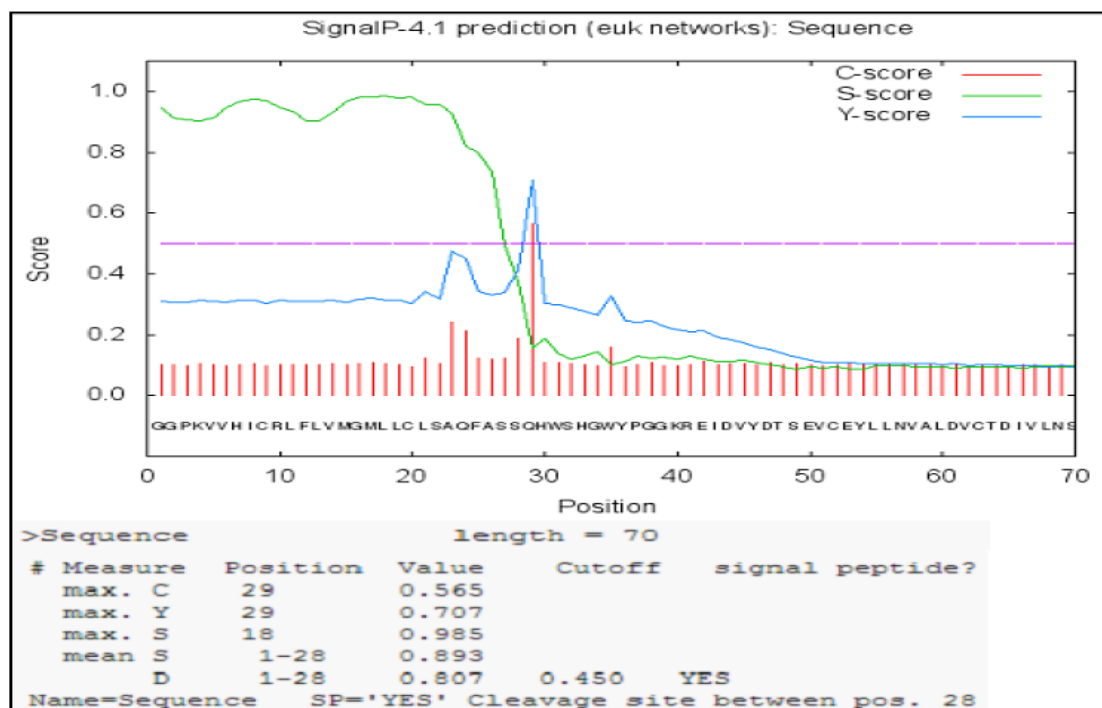
Konfirmasi sekuen asam amino diinterpretasikan sebagai asam amino penyandi GnRH-II yang memiliki urutan asam amino gen GnRH-II yang terdiri atas 10 asam amino dengan kode Q H W S H G W Y P G. Sampel terverifikasi hanya diperoleh pada Nilem Hijau Jantan *Forward*, Nilem Hijau Betina *Forward*, Nilem Hijau Betina *Reverse*, Nilem Merah Jantan *Forward*, Nilem Merah Betina *Forward* Untuk menguatkan hasil

verifikasi ini diperlukan analisis domain fungsional menggunakan program Conserved Domain NCBI untuk mengetahui fungsi biologis domain fungsional gen GnRH-II. Domain fungsional sebagai analisis biologis molekul GnRH-II adalah *gonadotropin releasing hormone* (Sherwood N, 2005). Hasil prediksi domain fungsional pada Nilem Hijau Jantan *Forward* diperoleh dengan menggunakan software Conserved Domain pada NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>).

Signal peptida dari sekuen asam amino GnRH-II nilem hijau dan nilem merah yang berhasil

diidentifikasi hanya terdapat pada sampel Nilem Hijau Betina arah *reverse* (Gambar 4.). Keberadaan signal peptida yang berada pada sekuen GnRH-II asam amino Nilem Hijau Betina arah *reverse*, yang sama dengan situs signal peptida pada cGnRH-II *Osteochilus hasselti* (Prayogo, 2011 ; Sherwood, 2005). Hasil prediksi domain fungsional situs signal peptida diperoleh menggunakan software SignalP 4.1

(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). Hasil Prediksi situs signal peptida nilem hijau betina (*reverse*) didapatkan pada posisi asam amino dari AA 1 s/d 24. menandakan bahwa domain fungsional situs signal peptida berhasil teridentifikasi. Posisi asam amino dari AA 1 s/d 24. menandakan bahwa domain fungsional situs signal peptida berhasil teridentifikasi. Hasil Prediksi Situs Signal Peptida Nilem Hijau Betina *Reverse* dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Hasil Prediksi Situs Signal Peptida Nilem Hijau Betina *Reverse*

Sedangkan *Similarity* struktur protein yang berdekatan dilakukan dengan analisa prediksi struktur protein dengan program Swiss Model (<http://swissmodel.expasy.org/>). Berdasarkan hasil prediksi struktur 3 dimensi yang disajikan pada Gambar 54 menunjukkan adanya tiga model struktur protein dengan sekuen yang dikenali masing-masing yaitu tubulin beta chain (Model 01) 16,67%, tubulin beta chain (Model 02) 21%, dan tubulin beta 2b-chain (Model 03) 24%.

Dari uraian diatas, dapat diketahui bahwa semua sekuen nukleotida dapat dikatakan homolog dengan *Osteochilus hasseltii* cGnRH-II gene, partial cds yang memiliki sequence id JN867722.1 dengan tingkat homologi tertinggi ditemukan pada Nilem Hijau Betina. Sedangkan sekuen protein, juga memiliki tingkat homologi yang tinggi dengan dua sekuen protein yang terdapat pada database NCBI. Salah satu sekuen, yakni Nila Merah Jantan yang diamplifikasi dengan

forward primer identik dengan sekuen protein dengan nomor aksesinya gbAFH41002.1.

Pada sekuen protein, terdapat perbedaan, dimana tiga sekuen dari Nilem Hijau memiliki sekuen homolog dengan gen penyandi GnRH II gbAFH41000.1, sedangkan Nilem Merah tidak memiliki sekuen yang homolog dengan gen penyandi GnRH II dengan nomor aksesinya tersebut.

DAFTAR PUSTAKA

- Ali, S.A. 2005. Kondisi Sediaan dan Keragaman Populasi Ikan Terbang (*Hirundichthys oxycephalus Bleeker*) di Laut Flores dan Selat Makassar. Disertasi Program Pascasarjana. Universitas Hasanuddin. Makassar. 280 hal.
- Cholik, F., A.K. Jagatraya, R.P. Poernomo, dan A. Jauzi. 2005. Akuakultur: Tumpuan Harapan Masa Depan Bangsa. Masyarakat Perikanan Nusantara dan Taman Akuarium Air Tawar-TMII, Jakarta.
- Djuhandana dan Tatang. 1981. Dunia Ikan. Armico, Bandung.

- Effendie, M.I., 1997. Metode Biologi Perikanan. Penerbit Yayasan Dewi Sri. Bogor. 112 hal.
- Effendie, M.I., 2002. Biologi Perikanan. Perikanan IPB. Yayasan Pustaka Nusantara, Yogyakarta. 163 hal.
- Hubbs, C.L. and K.F. Lagler. 1958. Fishes of the Great Lakes Region. University of Michigan Press, Ann Arbor, Michigan
- Lagler, K.F., J.E. Badach., R.R. Miller., and D.R.M Passimo. 1977. Ichthyology. John Wiley and Sons Inc. New York.
- Promega, 2010. Technical Manual Wizard Genomic DNA Purification Kit. USA
- Sherwood N.M and Adams B.A. 2005. *Gonadotropin-Releasing Hormone in Fish: Evolution, Expression and Regulation of the GnRH Gene*. Hormones And Their Receptors In Fish Reproduction. World Scientific Publishing. Canada
- Subagja, J., R. Gustiano, dan L. Winarlin. 2006. Pelestarian ikan nilem (*Osteochilus hasselti* CV) melalui teknologi perbenihannya. Prosiding Lokakarya Nasional Pengelolaan dan Perlindungan Sumberdaya Genetik di Indonesia, Bogor, 20 Desember 2006. Hal 279-286.
- Tang, U.M. dan Affandi, R. 2001. Biologi Reproduksi Ikan. Pusat Penelitian Kawasan Pantai dan Perairan Universitas Riau, Pekanbaru. 153 hal.
- Tenriulo, A., A.E. Suryati, Parenrengi dan Rosmiat. 2001. Ekstraksi Dna Rumput Laut *Kappaphycus Alvarezii* dengan Metode Fenol Kloroform. *Marina Chimica Acta*, Oktober 2001, hal.6-10 Vol. 2 No. 2. Jurusan Kimia FMIPA, Universitas Hasanuddin
- Wootton, R.J. 1998. Ecology of Teleost Fishes. Kluwer Academic Publihers (Fish and Fisheries Series No. 24), Dordrecht, The Netherlands.
- Yuwono T. 2006. Teori dan Aplikasi Polymerase Chain Reaction. Penerbit Andi. Yogyakarta.